

平成21年5月7日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590349

研究課題名（和文） 悪性リンパ腫・白血病のエピジェネティックな発症機構の解析

研究課題名（英文） Analyses of epigenetic mechanism of lymphomagenesis/leukemogenesis.

研究代表者

岡 剛史（OKA TAKASHI）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：50160651

研究成果の概要：

悪性腫瘍の発症機構に関する研究は、これまで癌遺伝子、癌抑制遺伝子の構造異常などを伴うゼネティックな変化に注目して研究が進められてきた。それに対し近年遺伝子の構造異常を伴わないエピジェネティックな機構による発癌が注目されてきている。我々は造血器腫瘍の発症機構をとくにエピジェネティックな機構に注目し解析を行い、HTLV-I, H. pyloriの感染によって異常なDNAメチル化が誘導・蓄積することが造血器腫瘍発症に重要であることを見いだした。これらの知見を元に造血器腫瘍を高感度に早期発見・早期診断することが可能になると期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分子病理学、腫瘍ウイルス学

科研費の分科・細目：基礎医学、人体病理学

キーワード：エピジェネティクス、悪性リンパ腫、白血病、ATLL, MALTリンパ腫、HTLV-I,

H. pylori

## 1. 研究開始当初の背景

近年の診断・治療技術の進歩に伴い悪性リンパ腫・白血病の予後は病型によっては顕著な進歩がみられている。しかし、最近疾患概念が確立したものなかで mantle cell lymphoma、nasal (type) NK/T cell lymphoma、adult T cell leukemia/lymphoma

(ATLL) はとくに病期の進んだ症例の予後は大変不良であり、このような難治性リンパ腫・白血病をどのように扱うかは焦眉の問題になってきている。mantle cell lymphomaは細胞学的には低悪性度に分類されているが病期の進んだ症例が断然多いと

いう特徴を示す。nasal (type) NK/T cell lymphoma はとくに鼻腔に発生するものは EB ウイルスとの関連が深く、現行の抗癌剤療法に対する反応性が全く悪いという問題点がある。Adult T cell leukemia/lymphoma (ATLL)は HTLV-I を原因ウイルスとする疾患であるが現在のところ有効な治療法が確立されていない。

## 2. 研究の目的

本研究はこれまでの我々の研究成果をふまえ、更に発展させ造血器腫瘍発症の分子機構を詳細に解析することが目的である。

ATLL をはじめとする様々なタイプの難治性白血病及びMALTリンパ腫, NK/Tリンパ腫をはじめとする各種リンパ腫の発症機構について特にエピジェネティックな異常の面から体系的・網羅的に詳細な解析を行う。ATLLにおいてはこれまでの腫瘍細胞側のターゲット遺伝子のメチル化が培養細胞だけでなく患者様の病態とどのような関連でメチル化が起こっていくのか詳細に解析を行う。そのことにより HTLV-I ウイルス感染により CIMP (CpG island methylator phenotype)をはじめとするエピジェネティックな異常が誘導されているのではないかという仮説の検証を行う。又急性型ATLLとリンパ腫型ATLLなど病型のちがいが何によって引き起こされているのか、さらに急性転化が起こるときに引き金になっているジェネティックあるいはエピジェネティックな変化は何か多くの患者検体を用いて明らかにする事が目標である。

MALTリンパ腫において我々は患者検体を用いた解析よりH. Pylori菌の感染がCIMPというDNAの異常メチル化を引き起こしMALTリンパ腫発症及び進展に関与していることを強く示唆するデータを得ている。更に直接的にH. pylori の感染がDNAの異常

メチル化を引き起こしていることを証明し、更にどのような機構によりこのようなエピジェネティックな異常を引き起こしているかそのメカニズムに関して解析を行う事が目標である。

## 3. 研究の方法

研究は様々な分子病理学的方法を駆使しながら研究を進めた。病理組織については通常のHE染色、免疫染色を用い組織学的な検討を行った。また患者の組織検体、末梢血よりDNA, RNA, 蛋白質を抽出精製し解析に用いた。DNAメチル化はMSP

(methylation specific PCR) 法, Bisulfite sequencing法により解析した。HTLV-Iのコピー数あるいはH. pylori菌の感染等はPCR法で、遺伝子発現についてはRT-PCR, Western blotting, 蛍光免疫染色、FACS解析の他、マイクロアレイ法を用いて網羅的解析を行った。

## 4. 研究成果

患者検体および培養細胞を用いた実験により造血器腫瘍の発症機構を詳細に解析した。ATLLをはじめとする様々なタイプの白血病及びMALTリンパ腫, NK/Tリンパ腫をはじめとする各種リンパ腫の患者検体が臨床の医師の御協力の下に集まってきている。これらの検体を用いて詳細な解析をおこなった結果, 以下の点が明らかとなった。

(1) HTLV-I キャリアーから症状の穏やかな indolent type であるくすぶり型または慢性型ATLLの発症さらに症状の激しい aggressive type ATLLへと進展するにともない特定の遺伝子のメチル化が誘導されメチル化遺伝子数が増加すること、様々な標的遺伝子が次々とメチル化される CIMP (CpG island methylator phenotype) という表現系の頻度が増大することが明らかとな

った。さらに発症の初期にメチル化される遺伝子群と aggressive type に進展する後期にメチル化の標的になる遺伝子群をそれぞれ同定することに成功した。このことによりこれらの遺伝子をマーカーとすることにより発症の早期発見・早期診断が可能な技術の開発に繋がった。ATLLにおいてはこれまでの腫瘍細胞側のターゲット遺伝子のメチル化とともに HTLV-I ウイルス自身のメチル化が患者様の病態とどのような関連でメチル化が起こっていくのか詳細に解析を進めて行くことにより ATLL の発症・進展の分子メカニズムの詳細が明らかとなるものと期待される。

(2) くすぶり型、慢性型、リンパ腫型、急性型 ATLL の病態の違いを規定している因子についてマイクロアレイ法をもちいて網羅的包括的に解析した。これらの解析により病型を規定する特定の遺伝子群の同定に成功した。これらの結果と免疫染色の解析、Flow Cytometry (FACS) 解析とを組み合わせ、細胞の微小環境、腫瘍細胞以外の細胞の関与・果たす役割について検討を進めている。

(3) MALTリンパ腫において我々は患者検体を用いた解析より H. Pylori 菌の感染が CIMP (CpG island methylator phenotype) というエピジェネティックな異常が様々なターゲット遺伝子の DNA 異常メチル化を引き起こし MALTリンパ腫発症及び進展に関与していることを強く示唆するデータを得た。更に H. Pylori 菌の感染から誘発された MALTリンパ腫からより高悪性度の悪性リンパ腫に進展する場合、特定の他の遺伝子群のメチル化が関与していることを明らかにした。これらの成果はエピジェネティック異常が悪性リンパ腫の発症・進展に重要な役割を果たしていることを強く示唆するばかりでなく、疾

患の早期発見・早期診断あるいは発症前リスク予測など臨床に於いて有用な技術の開発に繋がる。更に重要なことはエピジェネティック異常は可逆的変化であるという点である。今後エピジェネティック異常をターゲットとする治療法の開発にもつなげてゆきたいと考える。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Takami Kondo, Takashi Oka, Hiaki Sato, Yoko Shinnou, Kana Washio, Masayuki Takano, Toshiaki Morito, Katsuyoshi Takata, Nobuya Ohara, Mamoru Ouchida, Kenji Shimizu, and Tadashi Yoshino. Accumulation of aberrant CpG hypermethylation by *Helicobacter pylori* infection promotes development and progression of gastric MALT lymphoma. Int. J. Oncol. In press、査読有

2. Takata K, Sato Y, Nakamura N, Kikuchi Y.Y, Ichimura K, Tanaka T, Morito T, Tamura M, Oka T, Kondo E, Okada H, Tari A and Yoshino T. Duodenal and nodal follicular lymphomas are distinct: the former lacks activation-induced cytidine deaminase and follicular dendritic cells despite ongoing somatic hypermutation. Mod. Pathol. In press、査読有

3. Sato Y, Ichimura K, Tanaka T, Takata K, Morito T, Sato H, Kondo E, Yanai H, Ohara N, Oka T, Yoshino T. Duodenal follicular lymphomas share common characteristics with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. J Clin Pathol. 2008 Mar;61(3):377-81.、査読有

4. 岡 剛史、吉野正、リンパ系腫瘍における DNA メチル化異常、血液フロンティア 18(11):1-9, 2008、査読無

5. Shimakage, M., Inoue, N., Oshima, K., Kawahara, K., Yamamoto, N., Oka, T., Tambe, Y., Yasui, K., Matsumoto, K., Yutsudo, M., and Inoue, H. Down-regulation of drs mRNA

is associated with the progression of adult T-cell leukemia/lymphoma. *Int. J. Oncol.*, 30(6): 1343-8, 2007、査読有

6. Ohtsuki Y., Oka T., Manabe Y., Takeuchi T., Lee G, H., Furihata M., Yoshino T., Taguchi H. and Miyoshi I., Immunoelectron-microscopic study of CD4- and CD8-positive lymphocytes from healthy donors seropositive for human T-lymphotropic virus type I., *Biomedical Res.* 18(2): 83-88, 2007、査読有

7. Sato Y, Ichimura K, Tanaka T, Takata K, Morito T, Sato H, Sato Y, Kondo E, Yanai H, Ohara N, Oka T, Yoshino T. Duodenal follicular lymphomas share common characteristics with mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas. *J Clin Pathol.* 2007 ;61:377-381, 査読有

8. T. Oka., M. Ouchida., M. Tanimoto., K. Shimizu and T. Yoshino., High frequent gene silencing of hematopoietic cell specific protein tyrosine phosphatase SHP1 in hematopoietic cell malignancies. *Int. J. Med. Biol. Fronteiers* 2007: 11; 11-42、査読有

[学会発表] (計 22 件)

1. Masayuki Takano, Takashi Oka, Yoko Shinnou, Takami Kondo, Hiaki Sato, Kana Washio, Toshiaki Morito, Katsuyoshi Takata, Ichiro Murakami, Nobuya Ohara, Tohru Nakanishi , Tadashi Yoshino, Identification of the specific genes regulated by epigenetic mechanism during osteoblastic/adipocytic differentiations in human mesenchymal stem cells. 第31回日本分子生物学会、第81回日本精化学会合同大会, 2008年12月9-12日(神戸)

2. Kaduko Kurokawa, Hirofumi Fujita, Eri Oyanagi, Takashi Oka, Kozo Utsumi and Junzo Sasaki, Effect of nitrogen containing bisphosphonate on osteoblast differentiation of rat mesenchymal stem cell. 第31回日本分子生物学会、第81回日本精化学会合同大会, 2008年12月9-12日(神戸)

3. 佐藤妃映、岡 剛史、神農陽子、鷺尾佳奈、高田尚良、守都敏晃、田村麻衣子、黄 新剛、北村雄太、大原信哉、村上一郎、清水憲二、大内田守、谷本光音、大島孝一、宇都宮與、高橋聖之、吉野 正, 成人T細胞白血病/リンパ腫(ATLL)におけるDNAメチル化の解析, 第31回日本分子生物学会、第81回日本精化学会合同大会, 2008年12月9-12日(神戸)

4. Ichiro Murakami, Takashi Oka, Hiaki Sato, Toshiaki Morito, Katsuyoshi Takata, Yoko Shinno, Nobuya Ohara, Eisaku Kondo, Kiyoshi Takahashi, Takehiro Tanaka, Tadashi Yoshino, Immunohistochemical analyses of PTPN6(SHP1) on Langerhans cell histiocytosis, 67<sup>th</sup> Annual meeting of the Japanese Cancer association, October 28~30, 2008, (Nagoya)

5. Takata K., Oka T., Tanaka T., Sato H., Murakami I., Morito T., Takano M., Washio K., Otsuki T., and Yoshino T. Molecular Pathological examination on aberrant expression of cyclinD1 and CD79a in multiple myeloma cell lines. 67<sup>th</sup> Annual meeting of the Japanese Cancer association, October 28~30, 2008, (Nagoya)

6. 岡 剛史, 悪性腫瘍とエピジェネティクス; 造血器腫瘍発症・進展におけるエピジェネティック異常, 第40回日本臨床分子形態学会, 2008年10月4日(福岡)

7. Ichiro Murakami, Takashi Oka, Hiaki Sato, Yuta Kitamura, Toshiaki Morito, Katsuyoshi Takata, Yoko Shinno, Masayuki Takano, Kana Washio, Xingang Huang, Maiko Tamura, Naoko Ohnishi, Koichi Ichimura, Yasuharu Sato, Hiroyuki Yanai, Nobuya Ohara, Eisaku Kondo, Kiyoshi Takahashi, Takehiro Tanaka, Jean Gogusev, Francis Jaubert, Akira Morimoto, Shinsaku Imashuku, Tadaatsu Akagi, Tadashi Yoshino, IMMUNOHISTOCHEMICAL ANALYSES OF PTPN6 (SHP1) ON LANGERHANS CELL HISTIOCYTOSIS. XXIV Annual Meeting of the Histiocyte Society. Oct 1-3, 2008 Berlin, Germany.

8. 佐藤妃映、岡 剛史、神農陽子、鷺尾佳奈、高野正幸、高田尚良、守都敏晃、田村麻

衣子、黄 新剛、大西尚子、大内田守、大島孝一、宇都宮與、高橋聖之、谷本光音、吉野正，成人T細胞白血病/リンパ腫 (ATLL) における特異的DNAメチル化と病態・予後の相関，第1回HTLV1研究会，2008年8月20日、東京

9. 佐藤妃映、岡 剛史、神農陽子、鷺尾佳奈、高田 尚良、守都 敏晃、大原信哉、大内田守、大島孝一、谷本光音、宇都宮與、高橋聖之、吉野 正，成人T細胞白血病/リンパ腫 (ATLL) における特異的DNAメチル化と病態との関連，H20 リンパ網内系学会，2008年6月13～14日、(札幌)

10. Ichiro Murakami, Takashi Oka, Tadashi Yoshino, Immunohistochemical analysis of PTPN6 (SHP-1) on Langerhans cell histiocytosis. 第97回日本病理学会，2008年5月15～17日、(金沢)

11. 佐藤妃映、岡 剛史、神農陽子、鷺尾佳奈、高野正幸、高田 尚良、守都 敏晃、大原信哉、大内田守、大島孝一、宇都宮與、高橋聖之、吉野 正，成人T細胞白血病/リンパ腫 (ATLL) における特異的DNAメチル化と予後の相関について，第97回日本病理学会，2008年5月15～17日、(金沢)

12. 神農 陽子、岡 剛史、佐藤 妃映、高野 正幸、村上 一郎、鷺尾 佳奈、高田 尚良、守都 敏晃、黄 新剛、田村 麻衣子、大西 尚子、吉野 正，T cellリンパ腫におけるSHP1の発現低下と、脱メチル化処理による発現回復がSignal pathwayに及ぼす変化，第97回日本病理学会，2008年5月15～17日、(金沢)

13. 高橋聖之、富坂竜矢、西川由利子、佐藤妃映、岡 剛史、吉野正，樹状細胞と樹状マクロファージから見た胸腺腫のWHO分類，第97回日本病理学会，2008年5月15～17日、(金沢)

14. Ichiro Murakami, Takashi Oka, Hiaki Sato, Toshiaki Morito, Katsuyoshi Takata, Yoko Shinnou, Kana Washio, Masayuki Takano, Nobuya Ohara, and Tadashi Yoshino, Immunohistochemical analysis of PTPN6 (SHP1) on Langerhans cell histiocytosis. 66<sup>th</sup> Annual meeting of the Japanese Cancer association, October 3-5, 2007, Yokohma, Japan

15. Hiaki Sato, Takashi Oka, Yoko Shinnou, Kana Washio, Masayuki Takano, Nobuya Ohara, Mamoru Ouchida, Koichi Ohshima, Kenji Shimizu, Mitsune Tanimoto, Kiyoshi Takahashi, Atae Utsunomiya Tadashi Yoshino, Association of aberrant DNA methylation with clinicopathologic characteristics in Adult T cell leukemia/lymphoma (ATLL). 66<sup>th</sup> Annual meeting of the Japanese Cancer association, October 3-5, 2007, Yokohma, Japan

16. Masayuki Takano, Takashi Oka, Yoko Shinnou, Takami Kondo Hiaki Sato, Kana Washio, Ichiro Murakami, Nobuya Ohara, Tadashi Yoshino, Genes specifically changing DNA methylation during osteoblastic/adipocytic differentiations in mesenchymal stem cells. 66<sup>th</sup> Annual meeting of the Japanese Cancer association, October 3-5, 2007, Yokohma, Japan

17. Takata K., Oka T., Tanaka T., Sato H., Murakami I., Morito T., Takano M., Washio K., Otsuki T., and Yoshino T. Molecular Pathological examination on aberrant expression of cyclinD1 and CD79a in multiple myeloma cell lines. 6<sup>th</sup> Annual meeting of the Japanese Cancer association, October 3-5, 2007, Yokohma, Japan

18. 佐藤妃映、岡 剛史、近藤孝美、高野正幸、神農陽子、鷺尾佳奈、高田尚良、守都敏晃、大原信哉、大内田守、大島孝一、谷本光音、宇都宮與、高橋聖之、吉野 正，成人T細胞白血病/リンパ腫 (ATLL) における特異的DNAメチル化と病態・臨床症状との相関，第47回日本リンパ網内系学会総会，平成19年5月24日(木)・25日(金)・26日(土)，淡路

19. 近藤孝美、岡 剛史、神農陽子、佐藤妃映、鷺尾佳奈、高野正幸、高田尚良、守都敏晃、大原信哉、大内田守、吉野 正，胃原発悪性リンパ腫の発症・進展と特異的遺伝子のepigeneticな変化に関する検討，第47回日本リンパ網内系学会総会，平成19年5月24日(木)・25日(金)・26日(土)，淡路

20. Takashi Oka, Hiaki Sato, Yoko Nakatani, Takami Kondo, Kana Washio, Masayuki

Takano, Ichiro Murakami, Nobuya Ohara, Mamoru Ouchida, Koichi Ohshima, Kenji Shimizu, Mitsune Tanimoto, Kiyoshi Takahashi, Atae Utsunomiya, Tadashi Yoshino, EPIGENETICALLY DISTINCT MALIGNANT CELL POPULATION FORMS LYMPHOMA-INVOLVING LESION IN ACUTE TYPE ADULT T-CELL LEUKEMIA/LYMPHOMA (ATLL). 13th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, May 21-15, 2007, Hakone, Japan

21. Hiaki Sato, Takashi Oka, Yoko Nakatani, Takami Kondo, Kana Washio, Masayuki Takano, Ichiro Murakami, Nobuya Ohara, Mamoru Ouchida, Koichi Ohshima, Kenji Shimizu, Mitsune Tanimoto, Kiyoshi Takahashi, Atae Utsunomiya, Tadashi Yoshino, ABERRANT DNA METHYLATION IS ASSOCIATED WITH THE CLINICOPATHOLOGIC CHARACTERISTICS IN PATIENTS WITH ADULT T-CELL LEUKEMIA/LYMPHOMA (ATLL). 13th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, May 21-15, 2007, Hakone, Japan

22. Hiaki Sato Takashi Oka Yoko Nakatani Takami Kondo Kana Washio Masayuki Takano Nobuya Ohara Mamoru Ouchida Koichi Ohshima Kenji Shimizu Mitsune Tanimoto Kiyoshi Takahashi Atae Utsunomiya Tadashi Yoshino, CPG ISLAND METHYLATOR PHENOTYPE (CIMP) PROMOTES THE PROGRESSION OF ADULT T-CELL LEUKEMIA/LYMPHOMA (ATLL). 13th International Conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses, May 21-15, 2007, Hakone, Japan

〔産業財産権〕

○ 出願状況 (計 1 件)

産業財産権の名称：「成人T細胞白血病・リンパ腫 (ATLL) の予後推定法及びキット」, 発明者：岡 剛史、佐藤妃映、大内田守、吉野正, 権利者：岡山大学, 産業財産権の種類：特願 2008-71783, 出願 (取得) 年月日：2008. 3. 19 出願, 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡 剛史 (OKA TAKASHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：50160651

(2) 研究分担者

吉野 正 (YOSHINO TADASHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：70183704

大内田 守 (OUCHIDA MAMORU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号：80213635

(3) 連携研究者

無し